

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-66576

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
// C 0 7 K 14/32			C 0 7 K 14/32	
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 請求項の数27 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-208422	(71) 出願人	391032071 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ ブ NOVO NORDISK AKTIE SELSXAB デンマーク国, デーコー-2880 バグスバ エルト ノボ アレ (番地なし)
(22) 出願日	平成8年(1996) 8月7日	(72) 発明者	御代田 喜昭 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内
		(72) 発明者	福山 志朗 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内
		(74) 代理人	弁理士 大家 邦久 (外1名)

(54) 【発明の名称】 突出末端を有する2本鎖DNA及びこれを用いたDNAのシャフリング方法

(57) 【要約】

【解決課題】 天然に存在するDNAについて従来の方法とは大きく異なる変異法の提供およびそれによる有用な遺伝子産物の提供。

【解決手段】 (a) 遺伝子の一部と同一の配列を有する2本鎖DNAと(b) 前記遺伝子上で前記2本鎖DNA相当部分とは非連続な位置に存する塩基配列または前記遺伝子上にない塩基配列を有する1本鎖DNAからなり、1本鎖DNAが2本鎖DNAのいずれかの端部に連結して突出末端を形成していることを特徴とする突出末端を有するDNA、その製造方法、そのDNAを利用するDNAのシャフリング方法、そのシャフリング法で得られるDNA及びDNAプール、DNAプールの製造方法、並びにDNAプールに存在する遺伝情報を発現することによって得られる遺伝子産物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 遺伝子の一部と同一の配列を有する2本鎖DNAと(b)前記遺伝子上で前記2本鎖DNA相当部分とは非連続な位置に存する塩基配列または前記遺伝子上にない塩基配列を有する1本鎖DNAからなり、1本鎖DNAが2本鎖DNAのいずれかの端部に連結して突出末端を形成していることを特徴とする突出末端を有するDNA。

【請求項2】 (a) 遺伝子の一部と同一の配列を有する2本鎖DNA、(b)前記遺伝子上で前記2本鎖DNA相当部分とは非連続な位置に存する塩基配列または前記遺伝子上にない塩基配列を有する第1の1本鎖DNA、および(c) 前記遺伝子上で前記2本鎖DNA相当部分と連続する位置に存する塩基配列を有する第2の1本鎖DNAからなり、第2の1本鎖DNAは前記2本鎖DNAの当該連続する位置に相当する端部に、第1の1本鎖DNAは前記端部とは反対側の相補鎖の端部に連結してそれぞれ突出末端を形成していることを特徴とする突出末端を有するDNA。

【請求項3】 1本鎖DNAが2塩基以上の長さを有する請求項1または2に記載の突出末端を有するDNA。

【請求項4】 突出末端が3'端側に位置する請求項1乃至3のいずれかに記載の突出末端を有するDNA。

【請求項5】 DNAの一部を鋳型とし、少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼ反応を行なうことにより2本鎖DNAを調製し、しかる後、酵素反応または化学反応によってリボヌクレオチドを除去し、さらに該リボヌクレオチドの存在していた位置よりも5'端側に残存するヌクレオチドを除去することを特徴とする、突出末端を有するDNAの製造方法。

【請求項6】 下記a)～d)の工程：

a) (i) 遺伝子DNAの一部と同一の塩基配列を有するオリゴヌクレチドと(ii)遺伝子上で(i)の塩基配列とは非連続な位置に存する塩基配列またはその遺伝子上にない塩基配列を有し、少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを(ii)のオリゴヌクレオチドが(i)のオリゴヌクレオチドの5'端側に位置するように連結する工程；

b) 前記a) (i) のオリゴヌクレオチド相当部分を含むDNAを鋳型とし、工程a) で得られた連結オリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼ反応を行ない2本鎖DNAを調製する工程；

c) 酵素反応もしくは化学反応によって前記2本鎖DNA中のリボヌクレオチドを除去する工程；および

d) 前記リボヌクレオチドの存在していた位置よりも5'端側に残存するヌクレオチドを除去する工程；を有することを特徴とする、請求項1に規定する突出末端を有するDNAの製造方法。

【請求項7】 下記a)～d)の工程：

a) (i) 遺伝子DNAの一部と同一の塩基配列を有するオリゴヌクレチドと(ii)遺伝子上で(i)の塩基配列とは非連続な位置に存する塩基配列またはその遺伝子上にない塩基配列を有し、少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを(ii)のオリゴヌクレオチドが(i)のオリゴヌクレオチドの5'端側に位置するように連結する工程；

b) 前記a) (i) のオリゴヌクレオチド相当部分を含むDNAを鋳型とし、(i) 工程a) で得られた連結オリゴヌクレオチドと、(ii)その遺伝子上であってより前記オリゴヌクレオチド相当部分から3'端側に少なくとも3塩基以上離れた位置に存するオリゴヌクレオチドの相補鎖であって少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼ反応を行ない2本鎖DNAを調製する工程；

c) 酵素反応もしくは化学反応によって前記2本鎖DNA中のリボヌクレオチドを除去する工程；および

d) 前記リボヌクレオチドの存在していた位置よりも5'端側に残存するヌクレオチドをそれぞれ除去する工程；を有することを特徴とする、請求項2に規定する突出末端を有するDNAの製造方法。

【請求項8】 DNAを突出末端を有する複数のDNAブロックに分割し、これらを分割前とは異なる配列で連結することによるDNAのシャフリング方法。

【請求項9】 DNAの各部に請求項5乃至7のいずれかに規定する方法を適用することにより、DNAを、1のブロックの突出末端はもとのDNA上で隣接位置にないブロックの突出末端と相補的であるように、突出末端を有する複数のブロックに分割した後、分割前とは異なる配列で連結することによるDNAのシャフリング方法。

【請求項10】 DNAを3個以上のブロックに分割する請求項8または9に記載のシャフリング方法。

【請求項11】 DNAリガーゼを使用してブロックを連結する請求項8乃至10のいずれかに記載のシャフリング方法。

【請求項12】 請求項8乃至11のいずれかに規定の方法でシャフリングしてなるDNA。

【請求項13】 酵素機能をコードする遺伝子またはその制御遺伝子をシャフリングしてなる請求項12に記載のDNA。

【請求項14】 遺伝子が、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カタラーゼ、キシラーナーゼ、オキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシゲナーゼ、レダクターゼのうちのいずれかをコードする遺伝子である請求項13に記載のDNA。

【請求項15】 遺伝子が原核生物由来である請求項13または14に記載のDNA。

【請求項16】 遺伝子がバチルス属細菌由来である請求項15に記載のDNA。

【請求項17】 遺伝子がプロテアーゼAPI21遺伝子である請求項16に記載のDNA。

【請求項18】 請求項8乃至11のいずれかに規定するシャフリング方法によって得られる相異なる構造を有する複数種類のDNAを含有するDNAプール。

【請求項19】 10種類以上のDNAを含む請求項18に記載のDNAプール。

【請求項20】 鋳型DNAの各部に請求項5乃至7のいずれかに規定する方法を適用することにより、以下の条件を満たす突出末端を有するDNAブロックの混合物を調製し、これを任意の配列で連結することによるDNAプールの製造方法。

条件1：各ブロックは、それぞれ鋳型DNAの一部と同一の配列を有する2本鎖部分を有する。

条件2：ブロック混合物の成分であるブロックのうち、少なくとも2つは前記2本鎖部分に加えて鋳型DNA上で隣接位置にないブロックの突出末端と相補的である1本鎖部分（突出末端）を有する。

条件3：ブロック混合物は、2本鎖部分が同一であり1本鎖部分のみ異なる、条件2を満たすブロックを少なくとも2種類含む。

【請求項21】 鋳型DNAが、酵素機能をコードする遺伝子またはその制御遺伝子DNAである請求項20に記載のDNAプールの製造方法。

【請求項22】 鋳型DNAが、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カタラーゼ、キシラーゼ、オキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシゲナーゼ、レダクターゼのうちのいずれかをコードする遺伝子DNAである請求項21に記載のDNAプールの製造方法。

【請求項23】 鋳型DNAが、原核生物由来である請求項22に記載のDNAプールの製造方法。

【請求項24】 鋳型DNAがバチルス属細菌由来である請求項23に記載のDNAプールの製造方法。

【請求項25】 鋳型DNAがプロテアーゼAPI21遺伝子である請求項24に記載のDNAプールの製造方法。

【請求項26】 DNAブロックをDNAリガーゼにより連結する請求項20乃至25に記載のDNAプールの製造方法。

【請求項27】 請求項18乃至26に規定するDNAプールに存在するDNA分子の遺伝情報を発現することによって得られる遺伝子産物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、所望の配列からなる突出末端を有する2本鎖DNAおよびその製造方法、突出末端を有するDNAブロックを利用したDNAのシャフリング方法、当該方法によりシャフリングされたDNAおよび当該方法の応用により得られるDNAプー

ル、並びに当該プールによる遺伝子産物に関する。

【0002】

【従来技術】天然に存在するタンパク質を人間にとってより有用に改良するタンパク質工学の1つのアプローチとして、部位特異的変異によるタンパク質の改良があり、いくつかの成果が得られている（特開平5-91876号公報）。しかし、これには標的タンパク質の立体構造が判明していることが必要であり、立体構造の解析に多くの労力が必要である。また、立体構造が判明していても構造と機能の関係にはまだ不明なことが多く、狙った機能を確実に付与することは依然として困難である。

【0003】これらの困難を回避するために、ランダム変異とスクリーニングからなる方法や、生物の進化を利用した進化分子工学が脚光を浴びており、非常に有用であることが示されている（Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 83, 576 (1986)）。しかしながら、現在行なわれている方法は、多くて数個のアミノ酸置換である。WO 95/22625 には、複数の遺伝子をランダムに分割し、相対的組み換えによって遺伝子を再構築し、新規な遺伝子を作成する方法が記載されている。しかし、この方法はキメラ遺伝子作成の一方法であり、作成される遺伝子は当初の遺伝子と類似しており、塩基配列の大枠は維持されている。

【0004】このような既存の方法では生物が進化の過程で獲得できなかった機能の付与を望むことは困難である。自然界に存在するタンパク質等の遺伝子産物と機能が大きく異なる遺伝子産物を取得するためには、天然に存在する塩基配列空間とは大きく異なった核酸のプールを作り、その中から目的の機能を有する遺伝子産物を得ることが有効と考えられる。

【0005】そのための一つの方法として、全ての塩基の組合せからなる核酸プールを作ることが考えられる。しかし、100アミノ酸からなる比較的小さなタンパク質をコードする塩基配列（300塩基（bp））の総数でさえ、4の300乗（およそ10の180乗）通りという巨大な数となり、そのすべてを含む核酸プールを調製することは實際上、不可能である。

【0006】ある種のタンパク質についてモジュールと呼ばれるサブ構造に着目し、各モジュールに対応する塩基配列ブロックの順番を入れ換えて、モジュールの順番を変えた変異体を作り出す試みもなされている（Viva Origino vol. 23, No.1 (1995) 86-87）。しかし、この試みでは、それぞれの変異体について個別に遺伝子配列の並べ換えが行われており、順番が入れ替わった全ての分子種を含む核酸プールを作成すること、およびそのプールから所望の性質の産物を発現する遺伝子を取得することは未だなされていなかった。

【0007】制限酵素を利用し、同じ突出末端若しくは平滑末端を持つDNAブロックを数種類混合し、それらをランダムな順番に連結させることによりできた様々な

分子によって構成される核酸プールを作成し、そこから所望の性質を持つ分子を選別することは可能である。しかし、かかる方法ではDNA中に制限酵素認識部位が必要となる上、仮に制限酵素認識部位が存在しても、当該部位が希望の位置にある確率は極めて低い。またそのブロックの両端は同じ切り口である必要があり、自己連結する確率が高い。部位特異的変異により制限酵素認識部位を形成することも考えられるが、フレームに合わせて連結できるかどうかは偶然に支配される部分が大きい。すなわち、遺伝暗号の読み枠がずれずに、タンパク質が合成されるかどうかは偶然に支配され、極めて非効率的な方法である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、天然に存在する塩基配列空間とは大きく異なった空間に存在する塩基配列を効率的に得る方法、およびこのようにして得られた天然には存在しない核酸配列を遺伝子として発現させることによって得られる遺伝子産物を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】遺伝子の配列空間はA、G、C、Tの塩基を用いて理論的に作り得る全配列からなる。例えば、 n 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする塩基配列は、4つの塩基の中から任意の1つを $3n$ 回選択して順次並べることにより構成され、4の $3n$ 乗通り存在する。100アミノ酸のタンパク質であれば、前述の通り、およそ10の180乗通りの対応する塩基配列が存在する。実際にはタンパク質を構成するアミノ酸の数に制限は存在しないので、配列空間は無限の広がりを持つことになる。生物は進化の過程では、この配列空間のごく一部を試験したにすぎず、それ以外の大きな配列空間に極めて優れた機能を持つタンパク質をコードする配列がある可能性が大きい。現在多くの研究機関で行われているタンパク質工学的取り組みも天然に存在するタンパク質より機能において勝るタンパク質を創造することを目的としており、その主たるアプローチは、上述の通りアミノ酸置換である。しかしながら、アミノ酸置換は進化において生物が行なった主要な手法、つまり、生物の模倣であり、生物が試験した配列のごく近傍を探索するにすぎない。また、そうして得られた配列は過去において淘汰された配列である可能性もある。

【0010】本発明者らは、生物の試験した配列空間の近傍から大きく離れるには、生物が行ない得なかったことを実践すれば可能であると考えた。そして、遺伝子を数個のブロックに分け、それらの順番を変えることが、生物内で起きるには致死的事であることから、この目的に適した方法であると結論した。そして、鋭意研究を重ねた結果、任意のDNAに任意の突出末端を作る方法を発明し、その方法を利用することによって、遺伝子を数個のブロックに分け、それらの順番が入れ替わった配列空

間に位置する塩基配列を含む分子プールを作成することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち本発明は以下のものを提供するものである。

1) (a) 遺伝子の一部と同一の配列を有する2本鎖DNAと(b) 前記遺伝子上で前記2本鎖DNA相当部分とは非連続な位置に存する塩基配列または前記遺伝子上にない塩基配列を有する1本鎖DNAからなり、1本鎖DNAが2本鎖DNAのいずれかの端部に連結して突出末端を形成していることを特徴とする突出末端を有するDNA。

2) (a) 遺伝子の一部と同一の配列を有する2本鎖DNA、(b) 前記遺伝子上で前記2本鎖DNA相当部分とは非連続な位置に存する塩基配列または前記遺伝子上にない塩基配列を有する第1の1本鎖DNA、および(c) 前記遺伝子上で前記2本鎖DNA相当部分と連続する位置に存する塩基配列を有する第2の1本鎖DNAからなり、第2の1本鎖DNAは前記2本鎖DNAの当該連続する位置に相当する端部に、第1の1本鎖DNAは前記端部とは反対側の相補鎖の端部に連結してそれぞれ突出末端を形成していることを特徴とする突出末端を有するDNA。

【0012】3) 1本鎖DNAが2塩基以上の長さを有する前記1または2に記載の突出末端を有するDNA。

4) 突出末端が3'端に位置する前記1乃至3のいずれかに記載の突出末端を有するDNA。

5) DNAの一部を鋳型とし、少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼ反応を行なうことにより2本鎖DNAを調製し、しかる後、酵素反応または化学反応によってリボヌクレオチドを除去し、さらに該リボヌクレオチドの存在していた位置よりも5'端側に残存するヌクレオチドを除去することを特徴とする、突出末端を有するDNAの製造方法。

【0013】6) 下記a)～d)の工程：

a) (i) 遺伝子DNAの一部と同一の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと(ii) 遺伝子上で(i)の塩基配列とは非連続な位置に存する塩基配列またはその遺伝子上にない塩基配列を有し、少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを(ii)のオリゴヌクレオチドが(i)のオリゴヌクレオチドの5'端側に位置するように連結する工程；

b) 前記a) (i) のオリゴヌクレオチド相当部分を含むDNAを鋳型とし、工程a) で得られた連結オリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼ反応を行ない2本鎖DNAを調製する工程；

c) 酵素反応もしくは化学反応によって前記2本鎖DNA中のリボヌクレオチドを除去する工程；および

d) 前記リボヌクレオチドの存在していた位置よりも5'端側に残存するヌクレオチドを除去する工程；を有

することを特徴とする、前記1に規定する突出末端を有するDNAの製造方法。

【0014】7) 下記a)～d)の工程：

a) (i) 遺伝子DNAの一部と同一の塩基配列を有するオリゴヌクレチドと(ii)遺伝子上で(i)の塩基配列とは非連続な位置に存する塩基配列またはその遺伝子上にない塩基配列を有し、少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを(ii)のオリゴヌクレオチドが(i)のオリゴヌクレオチドの5'端側に位置するように連結する工程；

b) 前記a) (i) のオリゴヌクレオチド相当部分を含むDNAを鋳型とし、(i) 工程a) で得られた連結オリゴヌクレオチドと、(ii) その遺伝子上にあってより前記オリゴヌクレオチド相当部分から3'端側に少なくとも3塩基以上離れた位置に存するオリゴヌクレオチドの相補鎖であって少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼ反応を行ない2本鎖DNAを調製する工程；

c) 酵素反応もしくは化学反応によって前記2本鎖DNA中のリボヌクレオチドを除去する工程；および
d) 前記リボヌクレオチドの存在していた位置よりも5'端側に残存するヌクレオチドをそれぞれ除去する工程；を有することを特徴とする、前記2に規定する突出末端を有するDNAの製造方法。

【0015】8) DNAを突出末端を有する複数のDNAブロックに分割し、これらを分割前とは異なる配列で連結することによるDNAのシャフリング方法。

9) DNAの各部に前記5乃至7のいずれかに規定する方法を適用することにより、DNAを、1のブロックの突出末端はもとのDNA上で隣接位置にないブロックの突出末端と相補的であるように、突出末端を有する複数のブロックに分割した後、分割前とは異なる配列で連結することによるDNAのシャフリング方法。

10) DNAを3個以上のブロックに分割する前記8または9に記載のシャフリング方法。

11) DNAリガーゼを使用してブロックを連結する前記8乃至10のいずれかに記載のシャフリング方法。

12) 前記8乃至11のいずれかに規定の方法でシャフリングしてなるDNA。

【0016】13) 酵素機能をコードする遺伝子またはその制御遺伝子をシャフリングしてなる前記12に記載のDNA。

14) 遺伝子が、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カタラーゼ、キシナーゼ、オキシゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシゲナーゼ、レダクターゼのうちのいずれかをコードする遺伝子である前記13に記載のDNA。

15) 遺伝子が原核生物由来である前記13または14に記載のDNA。

16) 遺伝子がバチルス属細菌由来である前記15に記

載のDNA。

17) 遺伝子がプロテアーゼAPI21遺伝子である前記16に記載のDNA。

【0017】18) 前記8乃至11のいずれかに規定するシャフリング方法によって得られる相異なる構造を有する複数種類のDNAを含有するDNAプール。

19) 10種類以上のDNAを含む前記18に記載のDNAプール。

20) 鋳型DNAの各部に前記5乃至7のいずれかに規定する方法を適用することにより、以下の条件を満たす突出末端を有するDNAブロックの混合物を調製し、これを任意の配列で連結することによるDNAプールの製造方法。

条件1：各ブロックは、それぞれ鋳型DNAの一部と同一の配列を有する2本鎖部分を有する。

条件2：ブロック混合物の成分であるブロックのうち、少なくとも2つは前記2本鎖部分に加えて鋳型DNA上で隣接位置にないブロックの突出末端と相補的である1本鎖部分（突出末端）を有する。

条件3：ブロック混合物は、2本鎖部分が同一であり1本鎖部分のみ異なる、条件2を満たすブロックを少なくとも2種類含む。

【0018】21) 鋳型DNAが、酵素機能をコードする遺伝子またはその制御遺伝子DNAである前記20に記載のDNAプールの製造方法。

22) 鋳型DNAが、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カタラーゼ、キシナーゼ、オキシゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシゲナーゼ、レダクターゼのうちのいずれかをコードする遺伝子DNAである前記21に記載のDNAプールの製造方法。

23) 鋳型DNAが、原核生物由来である前記22に記載のDNAプールの製造方法。

24) 鋳型DNAがバチルス属細菌由来である前記23に記載のDNAプールの製造方法。

25) 鋳型DNAがプロテアーゼAPI21遺伝子である前記24に記載のDNAプールの製造方法。

26) DNAブロックをDNAリガーゼにより連結する前記20乃至25に記載のDNAプールの製造方法。

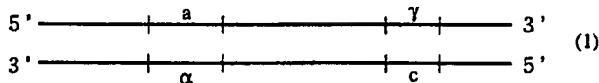
27) 前記18乃至26に規定するDNAプールに存在するDNA分子の遺伝情報を発現することによって得られる遺伝子産物。

【0019】以下、本発明を詳細に説明する。

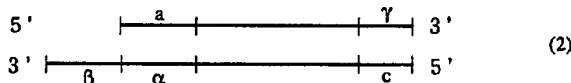
[突出末端を有するDNA] 本発明は任意の突出末端を有するDNA（以下、特に断らない限り「末端突出DNA」という。）を提供する。ここで、突出末端とは、2本鎖DNAの端部に突出した1本鎖部分をいう。このような突出末端はEcoRIのような制限酵素でDNAを切断した場合にも生じるが、この場合、突出末端の塩基配列は制限酵素により定まっており、その長さも通常は数塩基程度である。また、天然のDNAを制限酵素によ

り切断する場合は、2本鎖部分の配列も制限酵素認識部位に挟まれる領域に限定される。これに対し、本発明の末端突出DNAは、任意の配列を有する2本鎖DNAの末端に所望の長さおよび配列の突出末端を付加した構造をとるものである。

【0020】上述の通り、本発明の末端突出DNAにおける2本鎖部分の配列は特に限定されない。例えば、遺伝子の一部と同一の配列とすることができる。その長さも特に限定されないが、通常は、30塩基対(bp)以上、好ましくは45bp以上である。突出末端の配列も限定されないが、各種の反応において自己連結することを防ぐためにはステム構造をとる配列ではないことが好ましい。ここで、「ステム構造をとる配列」とは、例えば、AATTのような、その相補鎖(TTAA)と配列



(α および c は任意の配列。 a と r はそれぞれ α と c に相補的な配列である。)で表わされる2本鎖DNA(鎖

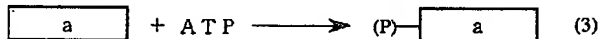


(式中、 β は突出末端の配列を示す。他の記号の意味は上記と同じ。)で表わされる構造を有する末端突出DNAを製造する方法について説明するが、他の構造を有する末端突出DNAについても同様に製造できる。

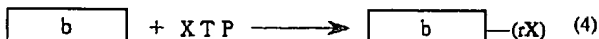
【0022】工程a

(a-1) オリゴヌクレオチドの調製

初めに、突出末端DNAの2本鎖部分として選択する部分を鋳型DNA上で定め、その端部 α に相補的なオリゴヌクレオチド a およびもう一方の端部 c と同一の配列を有するオリゴヌクレオチド c を調製する。 α および c は15~30個程度の塩基長を有する配列であればよい。また、突出末端配列(β)の5'末端から1塩基(Xとする。)を除いた配列に対し相補的なオリゴヌクレオチ



の(式中、(P)はリン酸基を表す。)。この反応は、ポリヌクレオチドキナーゼを作用させて行なうことができる。ATPはオリゴヌクレオチド a に対しモル比で2~10倍程度を用いる。反応温度は30~40℃程度であり、反応時間は10分~1時間程度である。pH7~



(式中、XTPはATP、GTP、CTP、UTPのいずれかを、(rX)はリボヌクレオチドを表す。)。この反応は、例えば、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを作用させて行なうことができる。用いるヌクレオシド三リン酸(XTP)には、工程(a-1)における塩基Xに対応するリボヌクレオチドが選択され

が全く同じになる配列のことである。突出末端の長さは通常は2塩基以上、好ましくは15塩基以上30塩基以下である。突出末端が長すぎると二次構造を形成し、分子間アニーリングが困難になり、短すぎると、融解温度(T_m)が低下し、アニーリングが不安定になる。突出末端は、2本鎖DNAの3'末端または5'末端のいずれに連結したものでもよいが、3'末端への連結が好ましい。一方の端部のみ突出末端を有する構造でもよいし、両端に突出末端を有する構造でもよい。

【0021】[末端突出DNAの製造方法]本発明の末端突出DNAは、典型的には、以下に示す工程a)~d)により製造することができる。なお、ここでは、次式(1):

【化1】

型DNA)をもとに次式(2):

【化2】

ド b を調製する。塩基配列 β は上記DNA上の一部でもよいし、上記DNA上にはない任意の配列でもよい。これらのオリゴヌクレオチド a 、 b および c はどのような方法により得られるものでもよい。予め配列がわかっているれば、既知のDNA合成装置を用いて合成してもよい。

【0023】(a-2) リボヌクレオチド含有断片の調製次にオリゴヌクレオチド a と b とをリボヌクレオチドを介して連結する。これは通常の合成法によってもよいが、次に示す方法も用いることができる。まず、オリゴヌクレオチド a の5'末端にリン酸基を付加する(次式(3)):

【化3】

9程度が最適である。リン酸基付加後のオリゴヌクレオチドを a' で表す。

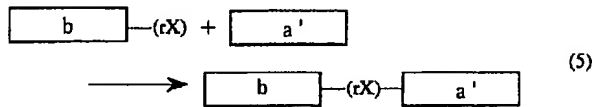
【0024】また、オリゴヌクレオチド b の3'末端にはリボヌクレオチドを付加する(次式(4)):

【化4】

る。ヌクレオシド三リン酸はオリゴヌクレオチド b に対しモル比で2~10倍程度を用いる。反応温度は30~40℃程度であり反応時間は30分~2時間程度である。付加後のオリゴヌクレオチドを b' で表す。 b' は配列 β と相補的な配列となる。

【0025】このようにして得られたオリゴヌクレオチ

ドa'とb'を混合し、b'のリボヌクレオチド3'末端(水酸基)にa'の5'末端(リン酸基)を結合する (次式(5)):

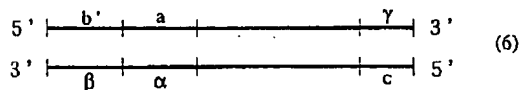


この反応は、例えば、ATPと2価金属イオンの存在下にRNAリガーゼを作用させることにより行なうことができる(特開平5-292967号公報)。有用な2価の金属イオンはマグネシウムイオン、マンガンイオン等であり、好ましくはマグネシウムイオンである。リガーゼとしてはRNAリガーゼを用いることができる。RNAリガーゼはRNAを3'末端の水酸基と5'末端のリン酸基とで連結させる酵素であるが、3'端のみがリボヌクレオチドであるポリデオキシリボヌクレオチドと5'リン酸基末端のポリデオキシリボヌクレオチドも効率的に連結する。好ましくはT4RNAリガーゼを用いる。反応は、通常、緩衝液中、pH7~9、10~40℃の温度で30~180分間かけて行なわれる。例えば、50mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM MgCl₂、0.1mM ATP、10mg/l BSA、1mM ヘキサアンミンコバルトクロライド(HCC)、25%ポリエチレングリコール6000溶液中、25℃で60分以上反応させる。

【0026】工程b

工程(a-1)の配列αを含むDNAを鋳型とし、工程(a-2)で得られた連結オリゴヌクレオチドb'-a'をプライマーとしてDNAポリメラーゼ反応を行ない2本鎖DNAを調製する。通常は、工程(a-1)の配列αとγとをそれぞれの鎖上に含む2本鎖DNAを熱またはアルカリ変性してそれぞれ1本鎖DNAとし、プライマーとしてb'-a'に加え工程(a-1)のオリゴヌクレオチドcを用いてPCRを行なう。プライマーのアニーリング条件、ポリメラーゼの反応条件は一般のポリメラーゼ反応における条件と同様である。DNAポリメラーゼとしては、Taqポリメラーゼ、クレノー断片(Klenow Fragment)、DNAポリメラーゼI等、DNA伸長反応を触媒する酵素ならば種類を問わない。反応の結果、下記式(6):

【化6】



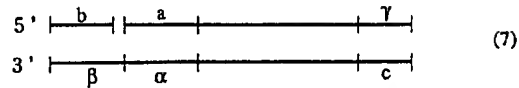
で表わされる末端が平滑な2本鎖DNAが得られる。

【0027】工程c

次いで、酵素反応もしくは化学反応によって前記2本鎖DNA中のリボヌクレオチドを除去する。有用な酵素の例としてはリボヌクレアーゼが挙げられる。反応は通常、pH6~8、30~70℃で10~60分間程度で進行する。非酵素的な薬剤としては水酸化ナトリウム等

が有用である。反応の結果、次式(7):

【化7】

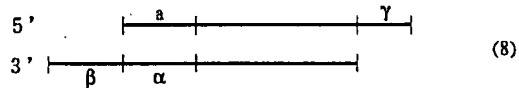


で表わされる、前記塩基Xに対応する部分が欠失した一部非連続な2本鎖DNAが得られる。

【0028】工程d

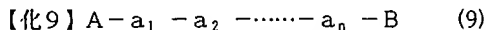
しかる後、前記欠失部よりも5'端側に残存するヌクレオチドを除去する。ヌクレオチドの除去は、例えば工程cでリボヌクレオチドの除去された2本鎖DNAを50~90℃程度に加熱することにより行なうことができる。この操作によって鎖から離れてきたポリヌクレオチドはスパンカラム等を用いて除くことができる。かくして、式(2)で表わされる末端突出2本鎖DNAを得ることができる。以上の説明では、一方の3'末端のみを突出末端としているが、上記方法に準じて他方の3'末端を突出末端とすることも可能である。また、上記の方法は、鋳型DNAにおいて配列αに連続する位置に存在しない任意の配列βを導入して突出末端としたが、鋳型DNAにおいて連続する位置に存在するオリゴヌクレオチドを突出末端とすることも可能である。例えば、上記の例で、オリゴヌクレオチドcに代えて、その3'末端のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたオリゴヌクレオチドc'をプライマーに用いることにより、次式(8):

【化8】

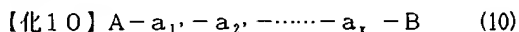


で表わされる両端突出DNAを調製してもよい。

【0029】[DNAのシャフリング方法] 本発明は、さらに、末端突出DNAを用いることを特徴とするDNAのシャフリング方法を提供する。ここで「シャフリング」(shuffling)とは、DNAを分割しこれを任意に配列し直す操作をいう。例えば、1個のDNAが次式(9):



(始端部Aおよび/または終端部Bはなくてもよい。)のようにn個のブロックの連結部分を含む配列で表される場合に、シャフリングは次式:



(式中、a₁'、a₂'、……、a_x'は、a₁、a₂、……、a_nからなる群よりそれぞれ独立に選ばれるブロック

クである。但し、 a_1, a_2, \dots, a_n のブロックの総数は a_1, a_2, \dots, a_n のブロックの総数に一致しなくてもよい。) で表されるDNAを与える操作である。

【0030】本発明による末端突出DNAを利用したDNAシャフリングの原理を図1に模式的に示す。図1では、DNAをその両端の部分 P_A と P_B については変更せず、中間部を $P_1 - P_2 - P_3$ (最上段) から $P_3 - P_1 - P_2$ (最下段) にシャフルしている。このようなシャフリングは、プロモータとターミネータの配列を変えないまま、従来存在しなかった遺伝子配列を得る方法として有用である。具体的には、初めに、鋳型DNAの各部 P_A, P_1, P_2, P_3, P_B に対して上記の突出末端DNA方法を適用し、両端突出型(式(8))構造を有するDNAブロック a_1, a_2, a_3 、並びに片端突出型(式(2))構造を有するDNAブロックAおよびBを調製する。突出末端 a_A および a_{1f} と a_{2f} と a_{3f} は、ブロック P_A, P_1, P_2 および P_3 からそれぞれに対応する相補鎖を除去して突出末端としたものである。

【0031】突出部分 a_{1f} と a_{2f} と a_{3f} および a_B は所望のシャフリング配列にしたがって設計される。図1の例では、 a_{1f} は a_{3f} の相補鎖として設計されており、シャフリング後にブロック a_1 はブロック a_3 と連結する。連結は、ATP存在下、DNAリガーゼを用いて連結する。DNAリガーゼの種類を問わないが、突出末端の一本鎖部分が長いので、通常の16℃で反応させる必要はなく、好熱性のDNAリガーゼを用いるのが有利である。同様に、図1の例では a_{2f} と a_{3f} および a_B はそれぞれ a_{1f} と a_A および a_{2f} の相補鎖として設計されている。この結果、最終的に $A - a_3 - a_1 - a_2 - B$ なる配列の構造が得られるが、これは、見掛け上は、分割前のDNAをブロック P_1, P_2, P_3, P_A, P_B に分割し、 $P_A - P_3 - P_1 - P_2 - P_B$ の順番に並べ換えたのと同じ結果になっている。

【0032】他の任意の配列も上記と同様に実現することができる。ブロックAまたはBを両端突出型とし、他のブロックを片端突出型とすれば、当該他のブロックを端に位置させるシャフリングも可能である。さらに、シャフリングに際し、もとの遺伝子に含まれない末端突出DNAブロックを導入してもよい。例えば、2個以上の遺伝子DNAに対してシャフリングを行なうことも可能である。この場合は、必要に応じ、一方の遺伝子の末端部、例えば上記例のブロックAについても両端突出DNAとする。

【0033】シャフリングの単位となるブロックは、2個以上のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド(以下、単に「オリゴヌクレオチド」という。)である。通常は、30個以上のヌクレオチド単位を含有することが好ましく、45個以上のヌクレオチド単位を含有することがより好ましい。ブロック

長の上限は1遺伝子の長さより短ければ特に限定されないが、ブロック長が長すぎると変異のない塩基配列部分が多く含まれることになるため、通常は遺伝子の長さの10~35%以下が好ましい。

【0034】また、シャフリングされる遺伝子がタンパク質をコードする遺伝子である場合、遺伝子ブロックであるオリゴヌクレオチドは、分割前後で読み枠が合うことが望ましい。つまり、シャフルされる遺伝子ブロックは、シャフリング後、相対的にどの位置に来ててもそのブロック部分が翻訳されて生ずるアミノ酸配列は同じであるように設計することが望ましい。このためには、遺伝子DNAの読み枠にしたがいコドン単位で2本鎖部分および突出末端を選択すればよい。もっとも、ブロックへの分割は遺伝子上の意味的なセグメントごとに行なう必要はない。すなわち、エクソンごとあるいはコードするタンパク質のドメインまたはモジュールに対応するセグメントごとに分割する必要はない。このような部位でのシャフリングは過去において自然界で試験された可能性がある。従来、自然界で試験されていない塩基配列を得るためには、エクソン内部、あるいはコードするタンパク質のドメインまたはモジュール内に相当する部位での分割が好ましい。

【0035】このような手法を採用することにより、全体としては天然のタンパク質とは構造が異なるが、部分的には自然界において有用であることが確認されているアミノ酸配列を含むタンパク質を得ることができ、完全にランダムに合成するよりも有用なタンパク質を得る確率が高くなる。

【0036】シャフリングの対象とする遺伝子の種類は特に限定されない。ポリヌクレオチド鎖から構成され、タンパク質またはRNAを発現するのに必要なコード領域であればよい。ヌクレオチド単位はデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれの分子を含むものでもよい。有用な塩基配列を見出すという目的からは、タンパク質、特に酵素をコードする遺伝子または酵素機能の制御遺伝子が好ましい。このような酵素の例としては、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カタラーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ、オキシゲナーゼ、レダクターゼ等が挙げられる。

【0037】遺伝子は生命体からクローニングしたもの、人工合成したもの、また、生命体からクローニングし、それに人工的に変異を加えたもの等、それを適当な宿主に導入すれば当該遺伝子の発現により遺伝子産物を生産するものであれば種類を問わない。生命体由来とする場合には、酵素産生能力の明確な原核生物を用いることができる。このような原核生物の例としては、バチルス属細菌が挙げられ、かかる細菌に由来の遺伝子の例としては、バチルスNK S-21(受託番号:FERM BP-93-1)に由来するプロテアーゼAPI 21遺伝子

(特開平 5-91876号公報)(配列番号1)が挙げられる。

【0038】[DNAプール]本発明はまた、前記のシャフリング方法を応用して得られるDNAプールに関する。ここで、「DNAプール」とは、2種類以上のDNAを高密度で含む混合物を意味する。本発明のDNAプールは、特定の数以上、例えば10種類以上の相異なる構造を有するDNA分子を含有するものとして行うことができる。生化学的な操作ないし反応に混合物のまま使用したときに複数の核酸成分について反応が進行し得る状態にあることが望ましいが、溶液状態、乾燥状態等の状態は問わない。DNAプールの製造は、前記シャフリングにおいて、各ブロックごとに突出末端を複数用意することにより行なうことができる。例えば、図1の例で、ブロック a_1 の突出末端 a_{1f} として、 a_{3f} の相補鎖に加えて、他の突出末端 a_{1f} 、 a_{2f} の相補鎖をも用いることにより、 $A-a_1-a_2-B$ 、 $A-a_1-a_2-a_1$ のようなDNAが得られる。 a_1 の他方の突出末端 a_{1f} の相補鎖を加えれば、 $A-a_1-a_1-a_1$ 等、同一ブロックが連続するDNAも調製可能である。同様に、 a_2 および a_3 の突出末端についても、他のブロックのまたは自己の他方の突出末端と相補的なオリゴヌクレオチドを加えれば、これらを含む他の配列が可能となる。

【0039】一般的には、あるDNAを a_1 、 a_2 、 a_3 、 \dots 、 a_n のブロックに分割する。各ブロックには、上記の方法に従い、突出末端を設ける。突出末端は、他のブロックのまたは自己の他方の突出末端と相補的なオリゴヌクレオチドとして設計する。得られたDNAブロックの全てまたは一部を混合し、これらを連結することにより、ランダムな順番にブロックが連結した核酸プールを作成することが出来る。

【0040】[シャフルされたDNAまたはDNAプール中の遺伝情報の発現]このようにしてシャフルされた単一のまたは混合物である二本鎖DNAを平滑化する。連結反応時に端部に片端突出型のDNAブロックを用いて平滑化を省略してもよい。例えば、一定のプロモーター配列を含むDNAブロックのプロモーターの向きを基準にした時の5'側を突出末端にせず、平滑末端にし、ターミネーター配列を含むDNAブロックのターミネーターの向きを基準にした時の3'側を突出末端にせず、平滑末端にする。これにより、プロモーターとターミネーターの間に目的遺伝子のブロックがシャフルした遺伝子を得ることができるとともに平滑化の省略が可能である。しかる後、DNAリガーゼを用い、任意のベクター、好ましくはpKK223-3の如き発現ベクターにシャフルされたDNAを組み込む。なお、プロモーター配列、ターミネーター配列は一種でも、複数種でもかまわない。

【0041】あるいは、両端に位置するポリヌクレオチドブロックに適当な制限酵素認識部位を作ることによ

り、その制限酵素を利用してベクターに連結することも可能である。次に、上記の如く作成したベクターライブラリーを適当な宿主に導入し、その遺伝情報を発現させることによって、好ましい性質を持つ遺伝子産物、およびそれをコードする遺伝子を取得することが出来る。宿主は慣用のものでよい。好ましい例としては、大腸菌*E. coli*、バチルス属細菌、酵母、乳酸菌等が挙げられる。

【0042】但し、試験管内転写系、翻訳系を使用することも可能であり、その場合は、ベクターに連結しなくても遺伝情報の発現が可能である。なお、「遺伝情報」とはDNAによって担われ、それ単独で、または他の配列からなるDNAまたはRNAと連結することによって、適当な生体内でタンパク質に翻訳される、あるいはRNAに転写されるものを言う。本発明の方法により発現が期待される遺伝情報は特に限定されないが、各種の遺伝子産物、例えば、酵素、抗体、ホルモン、レセプタータンパク質、リボザイム等あるいは、各種の制御機能、例えば、オペレーター、プロモーター、アテニューエーター等がその例として挙げられる。

【0043】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない

実施例1：DNAプールの製造

配列番号1に示すプロテアーゼAFI21(バチルスNK5-21(受託番号：FERM BP-93-1)からクローニングされた野生型アルカリプロテアーゼ(特開平5-91876号公報))に基づく核酸プールを以下の手順により製造した。

(1) 工程a：プライマー用オリゴヌクレオチドブロックの調製

(1-1) オリゴヌクレオチドブロックの合成

パーキンエルマー社のDNA自動合成機モデル392を用い、14種のオリゴヌクレオチド：オリゴFW(配列番号2)、オリゴRV(配列番号3)、オリゴ1r(配列番号4)、オリゴ1b(配列番号5)、オリゴ1a(配列番号6)、オリゴ2r(配列番号7)、オリゴ2b(配列番号8)、オリゴ2a(配列番号9)、オリゴ3r(配列番号10)、オリゴ3b(配列番号11)、オリゴ3a(配列番号12)、オリゴ4r(配列番号13)、オリゴ4b(配列番号14)、オリゴ4a(配列番号15)およびオリゴA(配列番号16)を合成した。これらはAPI21の塩基配列(特開平5-91876号公報)(相補鎖も含む)の一部からなる、若しくは一部を含むオリゴヌクレオチドである。但し、オリゴ4aは配列番号1のグルタミンの後の配列で遺伝子の終始コドン等を含む。また、これらのオリゴヌクレオチドは以後の実験でTaqポリメラーゼを用い、増幅DNAの3'末端にAがオーバーハングしたときに最適になるように設計した。各オリゴヌクレオチドの合成は、DMトリチロンで行ない(すなわち、ジメトキシトリチル基で

5' 水酸基を保護した。)、OPCカラムで精製した。試薬はパーキンエルマー社から購入したものをを用いた。

【0044】(1-2) リボヌクレオチドの付加

続いて、下記の組成:

50mM トリス-HCl緩衝液(pH 8.0)

10mM $MgCl_2$

5mM DTT (ジチオスレイトール)

25% PEG6000

1mM HCC (ヘキサアンミンコバルトクロライド)

10 μ g/ml BSA (牛血清アルブミン)

を有する標準溶液に、オリゴ1rを500pmol、ATPを1nmol及びターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを10ユニット添加し、全量を10 μ lとした。この溶液を37℃で1時間放置した。同様の操作をオリゴ2r、オリゴ3r、オリゴ4r、オリゴ1b、オリゴ2b、オリゴ3b、オリゴ4bについても行った。この操作で生成したポリヌクレオチド4種をそれぞれオリゴ1r'、オリゴ2r'、オリゴ3r'、オリゴ4r'、オリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'と呼ぶ。

【0045】(1-3) リン酸化

オリゴ1aを500pmol、ATPを1nmol及び、10ユニットのポリヌクレオチドキナーゼを前記と同じ組成の標準溶液に溶解して全量を10 μ lにした。この溶液を37℃で1時間放置した。同様の操作をオリゴ2a、オリゴ3a、オリゴ4aについても行った。この操作で生成したポリヌクレオチドをオリゴ1a'、オリゴ2a'、オリゴ3a'、オリゴ4a'と呼ぶ。

【0046】(1-4) オリゴヌクレオチドブロックの連結
前記で得られた、オリゴ1a'を500pmolと、オリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'それぞれ100pmol、ATP1nmol及び、T4RNAリガーゼ50ユニットを前記標準溶液に添加し、全量を10 μ lとして25℃で4時間反応させた。同様の反応をオリゴ2a'とオリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'、オリゴ3a'とオリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'、オリゴ4a'とオリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'の組合せでも行う。これらの反応によって生成したオリゴ1a'とオリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'が連結した4種のポリヌクレオチドの混合物をオリゴ1M、オリゴ2a'とオリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'が連結した4種のポリヌクレオチドの混合物をオリゴ2M、オリゴ3a'とオリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'が連結した4種のポリヌクレオチドの混合物をオリゴ3M、オリゴ4a'と

オリゴ1b'、オリゴ2b'、オリゴ3b'、オリゴ4b'が連結した4種のポリヌクレオチドの混合物をオリゴ4Mと呼ぶ。

【0047】(2) 遺伝子ブロックの作成
バチルスNKS-21からクローニングされた野生型アルカリプロテアーゼの遺伝子がpHSG396のClaI切断部位に挿入されているプラスミドpSDT812(特開平1-141596号公報)を鋳型、オリゴ1Mとオリゴ2r'をプライマーとしてPCRを行なった。この反応により増幅した遺伝子断片をリボヌクレアーゼ処理した後、80℃で5分熱処理し、両鎖若しくは一方の鎖に存在するリボヌクレオチドから5'側に位置するポリヌクレオチドを取り除く。これによって末端が突出末端である遺伝子ブロックを調製できる。この遺伝子ブロックをブロック1Mと呼ぶ。上記と同様の操作を、オリゴ2Mとオリゴ3r'、オリゴ3Mとオリゴ4r'、オリゴ4MとオリゴRV、オリゴFWとオリゴ1r'の4種の組合せでも行う。それぞれをブロック2M、ブロック3M、ブロックB、ブロックFと呼ぶ。

【0048】実施例2: シャフリング

ブロック1M、ブロック2M、ブロック3M、ブロックB、ブロックFを等量混合し、PfuDNAリガーゼで連結反応を行った。反応後、アガロースゲル電気泳動を行い、1.5キロ塩基対近傍を回収した。

【0049】実施例3: 核酸プールの確認

回収した約1.5キロ塩基対のDNAを制限酵素EcoRI、BamHIで消化し、制限酵素EcoRI、BamHIで消化し、アルカリフォスファターゼ処理をしたヤクルト本社製のプラスミドpHY300PLKと混合し、ライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結した。このDNAを用い、大腸菌JM105を形質転換し、テトラサイクリン耐性の形質転換体を選択した。これらの形質転換体から常法によりプラスミドDNAを抽出、精製、分析を行ない、pHY300PLKのEcoRI、BamHI認識部位間に1.5キロ塩基対のDNAが挿入されているクローンを97取得した。上記の如くして取得したDNAの塩基配列を解析し、ブロック1M、ブロック2M、ブロック3M、ブロックF、ブロックBがどのような順番で連結しているのか、つまり、どのようにシャフルしているのか確認した。理論通り、ブロックFが第一番目に位置し、ブロックBが第五番目に位置し、その二つの間でブロック1M、ブロック2M、ブロック3Mがシャフルしていた。表1に各シャフルの種類とそれに対するクローン数を記した。

【0050】

【表1】

シャフルの種類	数	シャフルの種類	数
111	2	223	2

112	5	231	5
113	2	232	2
121	3	233	3
122	4	311	2
123	7	312	6
131	4	313	5
132	5	321	7
133	3	322	2
211	1	323	5
212	5	331	2
213	4	332	5
221	1	333	2
222	3		

【0051】このように、本発明の方法によって遺伝子中の3つのブロックをシャフリングした場合、これらのブロックを重複を許して3個選択してなる全ての組合せのクローンを含む核酸プールを得られることが確認された。

【0052】実施例4：核酸プールから得られる遺伝子産物の選抜

実施例3で調製したDNAを混合し、これを用いて、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) UOT0999 を形質転換した。テトラサイクリン耐性で形質転換体を選択した。形質転換体300ヶをスキムミルク含有プレートにレプリカしたところ、12形質転換体のコロニーの周りにクリアゾーンを確認できた。これによって、シャフリングされた遺伝子によってコードされた酵素を活性によって選別出来ることが分かる。これらクリアゾーンを形成する12クロンの塩基配列を解析した結果、これらは野生型と同じブロック順になっていることがわかった。

【0053】実施例5：遺伝子産物の検出

実施例3で得られた形質転換体の中から選んだ10クロン（1クロンは、ハロー形成、9クロンは非形成）及び宿主である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) UOT0999 からそれぞれ全RNAを調製した。また以後のハイブリダイゼーションでプラスミドの影響を除くためにリボヌクレアーゼフリーのデオキシリボヌクレアーゼ処理をした。続いて、プローブにオリゴ1rを用い、常法に従ってノザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、形質転換体のRNAに対応するレーンには、すべてバンドが検出できたが、宿主のRNAに対応するレーンにはバンドが検出できなかった。

【0054】

【発明の効果】本発明によれば、任意の突出末端を有す

る2重鎖DNA分子を得ることができる。また、これを用いることにより、天然の塩基配列空間とは大きく離れた多様な塩基配列を含むDNAあるいはその混合物であるDNAプールを簡単な手順で得ることができるため、従来の方法では得られない、また、過去、生物により試験されたことのない優れた遺伝子産物、例えば、タンパク質や酵素を得ることが可能である。また、本発明の核酸プール製造方法では、必要に応じ、中間部ではランダムなシャフリングを実行しながら末端配置は所望の配列に固定した核酸の混合物を得ることが可能であり、また、各ブロックによりコードされるアミノ酸配列は変更せずにそのシャフリングを行なうことが可能であるため、完全にランダムな核酸プール製造方法と比較して、有用な遺伝子産物を生成する可能性が高い。

【0055】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1122

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：バチルスNKS-21（受託番号：FERM BP-93-1）

配列の特徴

特徴を表わす記号：sig peptide

存在位置：1..93

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：104..1112

特徴を決定した方法：S

配列

```

ATG AAT CTT CAA AAA ATA GCC TCA GCG TTG AAG GTT AAG CAA TCG GCA   48
Met Asn Leu Gln Lys Ile Ala Ser Ala Leu Lys Val Lys Gln Ser Ala
      -100                -95                -90
TTG GTC AGC AGT TTA ACT ATT TTG TTT CTA ATC ATG CTA GTA GGT ACG   96
Leu Val Ser Ser Leu Thr Ile Leu Phe Leu Ile Met Leu Val Gly Thr

```

-85	-80	-75	
ACT AGT GCA AAT GGT GCG AAG CAA GAG TAC TTA ATT GGT TTC AAC TCA	144		
Thr Ser Ala Asn Gly Ala Lys Gln Glu Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Ser			
-70	-65	-60	-55
GAC AAG GCA AAA GGA CTT ATC CAA AAT GCA GGT GGA GAA ATT CAT CAT	192		
Asp Lys Ala Lys Gly Leu Ile Gln Asn Ala Gly Gly Glu Ile His His			
-50	-45	-40	
GAA TAT ACA GAG TTT CCA GTT ATC TAT GCA GAG CTT CCA GAA GCA GCG	240		
Glu Tyr Thr Glu Phe Pro Val Ile Tyr Ala Glu Leu Pro Glu Ala Ala			
-35	-30	-25	
GTA AGT GGA TTG AAA AAT AAT CCT CAT ATT GAT TTT ATT GAG GAA AAC	288		
Val Ser Gly Leu Lys Asn Asn Pro His Ile Asp Phe Ile Glu Glu Asn			
-20	-15	-10	
GAA GAA GTT GAA ATT GCA CAG ACT GTT CCT TGG GGA ATC CCT TAT ATT	336		
Glu Glu Val Glu Ile Ala Gln Thr Val Pro Trp Gly Ile Pro Tyr Ile			
-5	1	5	10
TAC TCG GAT GTT GTT CAT CGT CAA GGT TAC TTT GGG AAC GGA GTA AAA	384		
Tyr Ser Asp Val Val His Arg Gln Gly Tyr Phe Gly Asn Gly Val Lys			
15	20	25	
GTA GCA GTA CTT GAT ACA GGA GTG GCT CCT CAT CCT GAT TTA CAT ATT	432		
Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Val Ala Pro His Pro Asp Leu His Ile			
30	35	40	
AGA GGA GGA GTA AGC TTT ATC TCT ACA GAA AAC ACT TAT GTG GAT TAT	480		
Arg Gly Gly Val Ser Phe Ile Ser Thr Glu Asn Thr Tyr Val Asp Tyr			
45	50	55	
AAT GGT CAC GGT ACT CAC GTA GCT GGT ACT GTA GCT GCC CTA AAC AAT	528		
Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn			
60	65	70	
TCA TAT GGC GTA TTG GGA GTG GCT CCT GGA GCT GAA CTA TAT GCT GTT	576		
Ser Tyr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Gly Ala Glu Leu Tyr Ala Val			
75	80	85	90
AAA GTT CTT GAT CGT AAC GGA AGC GGT TCG CAT GCA TCC ATT GCT CAA	624		
Lys Val Leu Asp Arg Asn Gly Ser Gly Ser His Ala Ser Ile Ala Gln			
95	100	105	
GGA ATT GAA TGG GCG ATG AAT AAT GGG ATG GAT ATT GCC AAC ATG AGT	672		
Gly Ile Glu Trp Ala Met Asn Asn Gly Met Asp Ile Ala Asn Met Ser			
110	115	120	
TTA GGA AGT CCT TCT GGG TCT ACA ACC CTG CAA TTA GCA GCA GAC CGC	720		
Leu Gly Ser Pro Ser Gly Ser Thr Thr Leu Gln Leu Ala Ala Asp Arg			
125	130	135	
GCT AGG AAT GCA GGT GTC TTA TTA ATT GGG GCG GCT GGA AAC TCA GGA	768		
Ala Arg Asn Ala Gly Val Leu Leu Ile Gly Ala Ala Gly Asn Ser Gly			
140	145	150	
CAA CAA GGC GGC TCG AAT AAC ATG GGC TAC CCA GCG CGC TAT GCA TCT	816		
Gln Gln Gly Gly Ser Asn Asn Met Gly Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Ser			
155	160	165	170
GTC ATG GCT GTT GGA GCG GTG GAC CAA AAT GGA AAT AGA GCG AAC TTT	864		
Val Met Ala Val Gly Ala Val Asp Gln Asn Gly Asn Arg Ala Asn Phe			
175	180	185	
TCA AGC TAT GGA TCA GAA CTT GAG ATT ATG GCG CCT GGT GTC AAT ATT	912		

Ser Ser Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ile Met Ala Pro Gly Val Asn Ile
 190 195 200
 AAC AGT ACG TAT TTA AAT AAC GGA TAT CGC AGT TTA AAT GGT ACG TCA 960
 Asn Ser Thr Tyr Leu Asn Asn Gly Tyr Arg Ser Leu Asn Gly Thr Ser
 205 210 215
 ATG GCA TCT CCA CAT GTT GCT GGG GTA GCT GCA TTA GTT AAA CAA AAA 1008
 Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Val Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys
 220 225 230
 CAC CCT CAC TTA ACG GCG GCA CAA ATT CGT AAT CGT ATG AAT CAA ACA 1056
 His Pro His Leu Thr Ala Ala Gln Ile Arg Asn Arg Met Asn Gln Thr
 235 240 245 250
 GCA ATT CCG CTT GGT AAC AGC ACG TAT TAT GGA AAT GGC TTA GTG GAT 1104
 Ala Ile Pro Leu Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly Leu Val Asp
 255 260 265
 GCT GAG TAT GCG GCT CAA 1122
 Ala Glu Tyr Ala Ala Gln
 270 272

【0056】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATTTTAGAA TTCGACGCGG

【0057】配列番号：3

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGGATTCCT TAAAGCCCTG AATAA

【0058】配列番号：4

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACAGTCTGTG CAATTC

【0059】配列番号：5

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAAATTGCAC AGACTGT

【0060】配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTTGGGGAA TCCCTTATAT

【0061】配列番号：7

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCCAATACGC CATATGA

【0062】配列番号：8

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCATATGGCG TATTGGG

【0063】配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGGCTCCTG GAGCTGAAC

【0064】配列番号：10

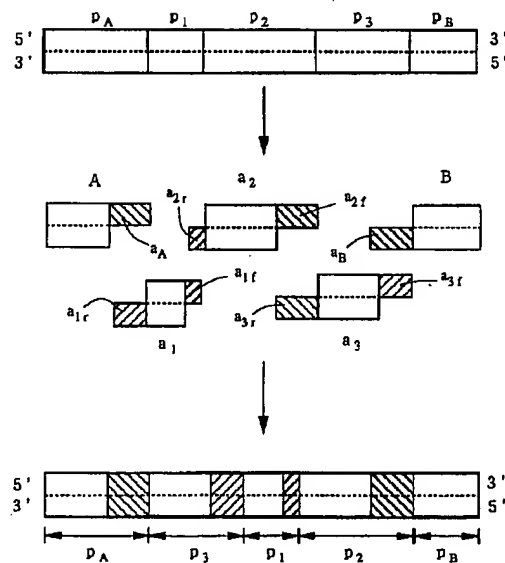
配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 TCTGATCCAT AGCTTG
 【0065】配列番号：11
 配列の長さ：16
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 CAAGCTATGG ATCAGA
 【0066】配列番号：12
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 CTTGAGATTA TGGCGCCTGG
 【0067】配列番号：13
 配列の長さ：17
 配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 TGAGCCGCAT ACTCAGC
 【0068】配列番号：14
 配列の長さ：17
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 GCTGAGTATG CGGCTCA
 【0069】配列番号：15
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：1本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列
 TAATCCCTAA GGATGTACTG
 【図面の簡単な説明】
 【図1】 本発明のDNAシャフリング方法の一態様を示す模式図。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
(C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:07)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:125)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:125)				

THIS PAGE BLANK (USPTO)